

猪假性狂犬病不活化疫苗佐劑之改進研究

鍾明華 劉堂輝 詹益波 邱資峰 曾正文

台灣省家畜衛生試驗所

未經濃縮及經分子量 100,000 濾過膜濃縮約 $\times 2.5$ 之假性狂犬病毒液，分別與葡聚醣及礦物油混合製成疫苗。以四週齡無抗體小豬，田間無抗體母猪及家兔測定其生產之抗體強度，抗體持續力，保護效力及副作用等，試驗成績顯示含濃縮病毒液之油劑疫苗在小豬之成績最佳，小豬在第二次注射二週後之中和抗體可達 1 : 50.7 幾何平均，12 週後仍保有 1 : 12.7 之抗體價，較其他疫苗及兩種國外產品為優。在田間應用結果，所有疫苗包括兩種國外疫苗均無不良副作用，母猪抗體反應却以濃縮病毒液之葡聚醣最高達 1 : 30，含濃縮病毒液之油劑疫苗次之 (1 : 22.6)。

M. tuberculosis H₃₇ Ra 乾燥菌體滲入無論是葡聚醣或油劑疫苗後，對四週齡小豬之中和抗體之產生均無幫助，但對整個免疫是否有助益，則囿於設備無法予以分析。

數年來，本所在農委會鼎力支持下，針對不活化疫苗之開發進行研究，尤其對不活化劑的試驗，曾嘗試紫外線照射，戊二醛及溴乙胺等物理方法及化學藥劑試製疫苗。紫外線照射試製之疫苗的效力十分優異⁽¹⁾，但因受輻射性衰退及培養液混濁，顏色等因素影響，其不活化效力不穩定。戊二醛 (glutaraldehyde) 係法國 Roger-Bellon 公司所採用的不活化劑。而另有一種在不活化疫苗研製上被大家所採用的不活化劑為乙胺 (EI) 衍生物早在 1963 年 Brown 等⁽²⁾ 即應用 AEI 於牛口蹄疫疫苗之製造，1975 年 Jakubik 等⁽¹²⁾ 亦利用 EEI 於假性狂犬病 (PR) 疫苗之研製，1978 年 Gutekunst 等⁽¹⁰⁾ 及 Sun 等⁽¹⁴⁾ 亦分別使用 AEI 及 BEI 於 PR 病毒之不活化，乙胺衍生物最大的優點是效力確實，且作用於病毒核酸，使病毒喪失感染力，而不破壞病毒抗原蛋白，使病毒抗原性得到最好的保全。

雖然不活化疫苗業已開發成功，並已商品化，但其疫苗製造技術上仍有再加改進之處，如佐劑之選用，影響疫苗品質之因素，除了不活化劑外，病毒力價及佐劑之種類即為重要之因素。對佐劑之選用上筆者曾以家兔初步測定葡聚醣 (DEAE - Dextran, D-D) 與礦物油 (Mineral oil) 等佐劑之效力；在病毒抗原未經濃縮之情況下，若病毒抗原在油劑疫苗中之佔有率 $\geq 50\%$ 時，油劑疫苗之效力與葡聚醣疫苗 (抗原佔有率為 80%) 相若。由於國外進口疫苗多屬油劑者，故引起一般農民熟者較優之疑問，為解此疑惑，故而進行此研究。本報告旨以免疫強度、免疫持續力、疫苗安全性、副作用等檢討兩種佐劑之優劣，同時探討 M. tuberculosis 菌體對疫苗免疫效力之影響。

試驗材料與方法

病 毒：

疫苗製造用及中和抗體測定用病毒皆為 PRV - TNL 株，係由本所於民國 68 年從發病小豬腦組織中分離者。

細 胞：

病毒增殖用細胞為 RK - 13 株化細胞，於 Eagle's MEM 培養液內，加入牛胎兒血清及新生小牛血清各 4% 及標準量之抗生素後作為細胞培養液。

病 毒 增 殖：

以迴轉培養瓶培養 RK - 13 細胞，約 72 小時後即接種病毒 (MOI 約為 0.1)。接種前需先將

培養液倒棄，接種後再經 37°C，60 分鐘吸著，然後加入不含血清之 MEM 培養液，再送 37°C 暖房，20-24 小時後收集細胞及病毒液，靜置於 4°C 冷室內先分離上層液，沈澱細胞以超音波處理，經 1,500 × g 離心除去細胞碎片，上層液混合後即供疫苗製造用。

病毒濃縮：

採用 pellicen (Millipore) 以 MW 100,000 過濾膜，將上述病毒液濃縮約 × 2.5。

病毒不活化：

在上述之未濃縮及濃縮後之病毒液內，加入 0.002 MBEI 在 37°C 暖房內攪拌 10 小時，將病毒不活化，不活化病毒液，取出 8 ml，肌肉注射家兔兩隻，每隻各 4 ml，證實病毒是否已被殺死

佐劑：

使用之佐劑分別為 DEAE - Dextrane (Pharmacia) 及礦物油 (Drakeol 6 - VR)。D-D 置於 0.85 % NaCl 溶液中，經高壓滅菌後使用；礦物油則加入第一乳化劑 Arlacel - A 後以 0.45 μ 濾過膜過濾之。

免疫刺激物 (immunopotentiator)：

Mycobacterium tuberculosis H₃₇Ra 乾燥粉末 (Difco)。

疫苗配製：

1. 病毒液 (未濃縮及濃縮)，礦物油，M. tuberculosis 之混合：將礦物油分二部份，一部份依 Freund⁽⁹⁾ 法加入適量之 M. tuberculosis (疫苗內濃度為 0.25 mg / ml)；另一部份則不加 M. tuberculosis。二者皆再依 Stone⁽¹³⁾ 法，將礦物油與病毒液，第二乳化劑 (Tween 80) 混合製成疫苗：

V 3：未濃縮病毒 + 礦物油。

V 4：濃縮病毒 + 礦物油。

V 7：未濃縮病毒 + 礦物油 + M. tuberculosis。

V 8：濃縮病毒 + 礦物油 + M. tuberculosis。

2. 病毒液 (未濃縮及濃縮)，D - D，M. tuberculosis 之混合：將 D - D 分二部份，一部份直接與病毒液混合製成疫苗；另一部份則加入 M. tuberculosis (疫苗內濃度亦為 0.25 mg / ml) 後，與病毒液混合製成疫苗。

V 1：未濃縮病毒 + D - D。

V 2：濃縮病毒 + D - D。

V 5：未濃縮病毒 + D - D + M. tuberculosis。

V 6：濃縮病毒 + D - D + M. tuberculosis。

國外進口疫苗：

一為來自法國 (F)，一為來自荷蘭 (H)，兩者均直接購自代理商。

家兔效力試驗：

60 頭家兔分為六組，按疫苗檢定方法，分別注射 V1, V2, V3, V4, F 及 H 疫苗之 $\frac{1}{3}$ 及 $\frac{1}{9}$ 劑量各 5 頭，二週後再注射同量疫苗，再二週以 100 LD₅₀ 病毒攻毒之，只有三頭在攻毒時分別注射 10LD₅₀，1LD₅₀ 及 $\frac{1}{3}$ LD₅₀ 病毒。1 劑量 (2 ml) 部份未做，V5, V6, V7, V8 疫苗家兔效力測定亦未實施。

小豬安全性及抗體反應試驗：

1. 20 頭 4 週齡無抗體小豬分為七組，第一至六組各三頭，分別注射 V1, V2, V3, V4, F 及 H 疫苗兩次，間隔為兩週。最後一組為對照組。

2. 另有 14 頭同齡無抗體小豬分為五組，第一至第四組各三頭，分別注射 V5, V6, V7, V8 疫苗兩次，間隔亦為二週，最後一組兩頭為對照。

所有試驗小豬均在每次疫苗注射後一週內每天測量體溫，觀察食慾及其他臨床症狀。並在注射

前及注射後每隔兩週採血，測定中和抗體。

田間母猪安全性及免疫反應試驗：

在宜蘭縣內選擇不曾使用過疫苗之四個養豬場共 160 頭母猪逢機平均注射 V1, V2, V3, V4, F 及 H 疫苗兩次，間隔兩週。部份母猪於每次疫苗注射後一週內每天測量體溫，觀察食慾及其他臨床症狀，並於疫苗注射前及第二次注射二週後採血，測定中和抗體。

中和抗體測定：

依鍾氏等法⁽²⁾行之，但稀釋器則改用八道 multichannel micropipette (Flow) 行之。

結 果

1. 疫苗對小豬及母猪安全性及副作用試驗：

各種疫苗包括 V 1 ~ V 8 及 F、H 兩種國外疫苗對小豬均無任何不良副作用，但是油劑疫苗包括國外兩種油劑疫苗偶而會在注射部位形成腫塊，不過會在 3 - 4 週後自然消失。母猪對 V 1 - V 4 及 F、H 兩種疫苗亦無不良反應。

2. 家兔效力試驗：

V 1 - V 4 及 F、H 疫苗按檢定規則注射，攻毒結果如表 1 所示，所有疫苗不僅達到檢定標準，成績且十分優異，尤以濃縮抗原之油劑疫苗 (V 4) 之成績最佳， $\frac{1}{9}$ 劑量注射家兔全數耐過。部份家兔在實驗期間罹患球蟲症下痢而死亡，不予計算。對照家兔接種 10 RLD₅₀ 及 1 RLD₅₀ 者均於攻毒五天後斃死，意即攻擊用病毒含量 ≥ 100 RLD₅₀。

表 1 各種疫苗家兔效力比較試驗

疫 苗	劑 量	接 種 頭 數	攻 毒 結 果
V1	1 / 3	3	3 / 3 ※※
	1 / 9	5	3 / 5
V2	1 / 3	5	5 / 5
	1 / 9	5	4 / 5
V3	1 / 3	2	2 / 2
	1 / 9	4	2 / 4
V4	1 / 3	3	3 / 3
	1 / 9	3	3 / 3
F	1 / 3	3	3 / 3
	1 / 9	5	3 / 5
H	1 / 3	4	3 / 4
	1 / 9	3	2 / 3
Control	—	1	D※
	—	1	D
	—	1	S

※D = Death
S = Survive

※※分子 = 存活數
分母 = 接種數

3. 疫苗對小豬之抗體反應：

(1) 20 頭無抗體四週齡小豬分別注射 V1~V4 及 F, H 等疫苗之抗體反應如表(2)第二次注射係在 PVW 2 採血後行之。各組小豬在一次注射後即可測得 1:1.6~3.2 之微量抗體，注射 F 疫苗之小豬則無法測得抗體。所得免疫小豬之抗體力價均在第二次注射二週後 (PVW4) 到達頂點，其中又以注射濃縮抗原油劑疫苗者最高 (1:507)，亦即免疫強度最高。其他各組小豬抗體約略相近，無甚差異。但各種疫苗之免疫持續力在第一次注射十週後 (PVW 10) 即顯露無遺，其中注射 F 疫苗小豬之抗體已消失殆盡，注射 V4 疫苗小豬仍保有 12.7 之抗體，由此可知 V4 疫苗無論是免疫強度或免疫持續力均優於其他疫苗。

表 2：各種疫苗對小豬之免疫反應

小豬數量	疫 苗	中 和 抗 體 價 (GMT) (PVW)						
		0	2	4	6	8	10	12
3	V 1	0	1.6	20.1	10.0	3.2	2.0	1.3
3	V 2	0	1.6	15.9	12.7	8.0	3.2	2.5
3	V 3	0	1.6	31.9	12.9	10.0	6.3	5.0
3	V 4	0	3.2	50.7	40.3	25.2	20.1	12.7
3	F	0	0	8.0	6.3	3.2	1.3	0
3	H	0	1.6	15.9	10.0	6.3	3.2	2.0
2	Control	0	0	0	0	0	0	0
3	V 5	0	0	8.0	3.2	1.6	0	0
3	V 6	0	1.3	15.9	6.3	1.6	1.3	0
3	V 7	0	4.0	15.9	15.9	5.0	2.0	0
3	V 8	0	4.0	50.7	31.9	12.7	10.1	3.2
2	Control	0	0	0	0	0	0	0

4. M. tuberculosis H₃₇Ra 菌體對疫苗免疫反應之影響：

14 頭無抗體四週齡小豬分別注射 V5~V8 疫苗，小豬之免疫反應及抗體消長趨勢與 V1~V4 者相似，但強度稍差亦即在第一次注射後部份小豬可測得微量抗體，在 PVW 4 時達最高峯，且以濃縮抗原油劑疫苗 (V8) 最佳。免疫持續力亦不如 V1~V4 者，在 PVW 12 時，V5, V6, V7 疫苗注射小豬之抗體全部消失，僅 V8 尚保有 1:3.2 之抗體力價 (如表 2)。由此觀之，M. tuberculosis 菌體對疫苗在抗體產生上並無助益。

5. 各種疫苗對母豬之安全性及免疫反應：

160 頭未配種及不同懷孕時期之母豬分別注射 V1~V4 及 F, H 兩種國外疫苗兩次，部份母豬注射後體溫均維持正常，亦無其他不良副作用，由此顯示無論油劑或葡聚醣疫苗對母豬均甚安全，而母豬之抗體反應與小豬反應大致相同 (如表 3)。但其中却以 V2 (濃縮抗原葡聚醣疫苗) 達 1:30 為最高，V4 之 1:22.6 次之，兩種國外疫苗較差，僅達 1:6.3 及 1:6.4。

表3 母豬對各種疫苗之免疫反應

母豬頭數	疫 苗	中 和 抗 體 (GMT)	
		注 射 前	二次注射後
7	V1	0	8.5
7	V2	0	30
6	V3	0	10
6	V4	0	22.6
5	F	0	6.3
6	H	0	6.4

討 論

在不活化疫苗製造上，佐劑對疫苗之免疫效力之提昇極為重要。不活化疫苗加入佐劑後要比單獨使用抗原時產生更好的免疫性⁽⁶⁾。佐劑的種類繁多，但目前最被廣泛應用於動物用疫苗者則應屬礦物油。其優點在於可以延遲吸收，持續刺激免疫之產生，延長疫苗有效期間⁽⁶⁾，此外亦可促進細胞免疫(CMI)之產生(D-D)葡聚醣則一樣可藉發炎作用吸引單核球及巨噬球，而使得抗原得以被處理，而產生抗體及細胞免疫⁽⁷⁾。本試驗含濃縮抗原之油劑疫苗注射小豬在注射三個月後仍然保有1:12.7之抗體力價，比葡聚醣疫苗之1:2.5，含未濃縮抗原者亦同，與國外兩種油劑疫苗相較有過之而無不及。雖然油劑疫苗較葡聚醣疫苗為優，但在製作上却困難甚多。若依Herbert法⁽¹¹⁾，在製備water-in-oil乳劑時，黏性增加，大量製造時不易克服，若依Stone等法⁽¹³⁾，則無此困難，但安定性稍差。本試驗抗體測定所用的病毒亦為PRV-TNL株是否會因病毒株間之些微差異而使中和抗體力價有所影響則未可知，雖然PR病毒血清型祇有一種。

M. tuberculosis 菌體有被 Freund⁽⁹⁾ 滲入礦物油中而成為 Freund complete adjuvant (FCA)，1980年 Bomford⁽³⁾ 發現不完全佐劑(FIA)遠比FCA對免疫抗體之產生為優，但 Bomford 又稱FCA比FIA更能刺激CMI之產生。對PR言，細胞免疫之重要性已被確認。在免疫刺激物方面，Bomford認為Corynebacterium parvum比M. tuberculosis 效果更佳，可以取代用以促進CMI之產生⁽⁴⁾。本試驗係採用後者，結果顯示此物質對抗體之產生並無幫助，與Bomford之結論一樣，但囿於設備，無法對CMI之影響加以具定。

油劑疫苗製作時，為了獲得安全，低黏度之疫苗，抗原(aqueous phase)與礦物油(oil phase)之比例一定，無法隨意調整，抗原佔有率一般皆在30%以下，此時若不將抗原加以濃縮，相對提高抗原佔有率，則疫苗之效力將成疑問。筆者前曾以MW 100,000濾過膜(Millipore)濃縮病毒液×3，但效果不佳。1983年 Bund⁽⁶⁾在PR病毒及感染細胞中發現有四種分子量介於59,000~130,000之醣蛋白，其中主要的醣蛋白分子量為90,000，因此推測前試驗效果不佳的原因，可能係由於醣蛋白的喪失，本試驗中將濃縮方法加以改良，再以MW 100,000濾過膜濃縮病毒液×2.5，即獲得良好的效果。

由小豬及母豬試驗中得知，油劑及葡聚醣疫苗均甚安全，無副作用，但油劑疫苗偶而會引起肉芽腫，不過這些腫塊會在數週內消失，葡聚醣疫苗則全無此現象，且根據農民在緊急預防之經驗認為，葡聚醣對疫情之控制比油劑快約二週，此或與葡聚醣較易吸收，也易於發揮免疫效力有關，本試驗中由於試驗豬場無疫情發生無法加以證實。

誌 謝

本試驗承農委會經費補助始得以完成，又蒙農委會鍾博處長、林再春科長及劉永和技正之指導，謹誌謝忱。同時亦感謝宜蘭縣家畜疾病防治所羅浴沂所長、黃壽華技正及賴東明股長之相助，使本試驗得以順利推行。本組織培養疫苗研究室陳由昌、李金乾、林正男、許益嘉先生協助之功亦衷心感謝。

參 考 文 獻

1. 鍾明華、賴秀穗、林榮培：豬假性狂犬病不活化疫苗免疫效力，省畜衛試研報 151:63 - 68，1978。
2. 鍾明華、劉堂輝、詹益波、邱資峯、曾正文：豬假性狂犬病次單位疫苗之開發，刊印中。
3. Bomford, R: The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity (I) Clin. exp. Immunol 39: 426-434, 1980。
4. Bomford, R: The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity (II) Clin. exp. Immunol 39: 435-441, 1980。
5. Brown, F., N. S.T.G. Hyslop, J. Crick, and A.W. Morrow: The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines J. Hyg. Comb 6: 337-344, 1963。
6. Bund, K.F.: Identification, characterization and localization of Aujeszky's Virus-specific antigens and their importance in the immune response. Inaugural Dissertation, Fachbereich Veterinarmedizin der Freien Uni. Berlin. 1983。
7. Collins, F.M.: Vaccines and cell-mediated immunity Bacteriol. Rev. 38: 371-402, 1974。
8. Edelman, R: Vaccine adjuvants. Infec. Dis. 2: 370-383, 1980。
9. Freund, J: The mode of action of immunological adjuvants. Advan. Tuberc. Res. 1: 130-148, 1956。
10. Gutekunst, D.E.: Immune responses in swine given lipid-conjugated pseudorabies viral antigen, Am JVR 39: 1435-1437, 1978。
11. Herbert, W.J.: Multiple emulsions, a new form of mineral-oil antigen adjuvant, Lancet ii 771, 1965。
12. Jakubik, J., G., Wittmann and R. Skoda: Immunisierung von kalbern mit der EEI / DEAE - Dextran-vakzine gegen die Aujeszky'sche krankheit, Zbl. Vet. Med. B. 22: 827-832, 1975。
13. Stone, H.D., M. Brigh and C.W. Beard: Comparison of three experimental inactivated oil-emulsion Newcastle Disease vaccines. Avian dis 25: 1070-1076, 1981。
14. Sun, I.C., D.P. Gustafson and G. Scherba: Comparison of pseudorabies virus inactivation by Bromo-Ethylene-Imine, Co irradiation, and Acridine dye in immune assay-system. J. Clin. Microbiol. 8: 604-611, 1978。
15. Wittmann G., B. Dietzschold and K. Bauer: Some investigation on the adjuvant mechanism of DEAE-Dextran. Arch. Virol. 47: 225-235, 1975。

Improvement of The Techniques on Pseudorabies Inactivated Vaccine Production Based on Adjuvant Selection

M.H. Jong, T.H. Liu, I.P. Chan, T.F. Chiou, C.W. Tseng

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Several pseudorabies (PR) inactivated vaccines were prepared by incorporating non-concentrated or concentrated PR viral suspension into mineral oil or DEAE-Dextran. The intensity, persistency, and protective efficiency of each vaccine and two imported vaccines were evaluated in 4-week-old pigs, sows, and rabbits. Results indicated that serum neutralizing antibody titer of those pigs which were vaccinated with concentrated viral suspension and mineral oil reached 1:50.7 (GMT) at two weeks post the second vaccination (PVW 4), and maintain the titer of 1:12.7 till PVW 12. The vaccine also showed the best protective efficiency in rabbits. All vaccines did not induce any side-reactions in antibody free sows. However, the vaccine of concentrated and DEAE-Dextran induced the highest titer (1:30) in sows. Dry *M. tuberculosis* H37Ra could not enhance the humoral antibody response in pigs, no matter it was in mineral oil or in DEAE-Dextran. But, the effects of the bacterium on the cellular immunity could not be analysed by the limitation of equipments.

